

Remarks

Further and favorable reconsideration is respectfully requested in view of the foregoing amendments and following remarks.

Initially, Applicant wishes to thank the Examiner for her helpful comments during the telephone conversation with Applicant's representative on February 20, 2007, during which the Examiner indicated that incorporating a step of separating the fish egg skin from the rest of the eggs would be very helpful.

Claims 1 and 2 have been amended to include a step of separating the fish egg skin from the rest of the eggs. Support for these amendments is found in Example 1 on page 8 of the specification. Therefore, no new matter has been added to the application.

Although these amendments are presented after final rejection, the Examiner is respectfully requested to enter and consider the amendments, as they place the application in condition for allowance.

The patentability of the present invention over the disclosures of the references relied upon by the Examiner in rejecting the claims will be apparent upon consideration of the following remarks.

The rejection of claims 1 and 2 under 35 U.S.C. § 103(a) as being unpatentable over JP 030153368 (abstract) in view of Haraguchi et al., Takasaki et al. and Blinkovsky et al. is respectfully traversed.

The Examiner takes the position that the features upon which Applicant relies (i.e., that only the skins of the fish eggs are subjected to the method) are not recited in the claims. The Examiner further states that the claims include Applicant's narrow reading of exclusively "fish egg skins" as well as fish egg skins that are still attached to the rest of the egg. Additionally, the Examiner asserts that the claims are not commensurate in scope with the alleged unexpected results.

However, as stated above, Applicant has amended the claims to incorporate a step of separating the fish egg skin from the rest of the eggs.

Applicant's amended claims are directed to a method for producing amino acids and peptides from a fish egg skin, comprising processing roe grains surrounded by a fish egg skin to remove the roe grains, treating the fish egg skin with ozonized water, and treating the ozonized water-treated fish egg skin with a proteolytic enzyme produced by a

microorganism of the Bacillus genus [and a proteolytic enzyme produced by a microorganism of the Aspergillus genus (claim 2)] to degrade contractile proteins which constitute the fish egg skin, to obtain amino acids and peptides.

The term “fish egg skin” is used to refer to “fish ovary sac” obtained from a fish whole ovary by removing individual eggs from the whole ovary. (See Appendix 5, attached hereto). Fish egg skins produced during the processing of fish eggs are generally discarded as industrial wastes. However, the amino acids and peptides produced by Applicant’s claimed method are unexpectedly valuable. Please see Appendix 1 (a portion of which is translated as Appendix 2), both attached hereto. Specifically, a composition comprising amino acids and peptides made according to Applicants’ invention showed antitoxic action.

In light of the above-discussed amendments, Applicant respectfully requests that the Examiner reconsider the arguments set forth in the Amendment filed November 2, 2006. These arguments are essentially restated below (with some alterations based on the claim amendments) for the Examiner’s convenience.

Applicant’s claims recite a novel and unobvious method for producing amino acids and peptides from a fish egg skin, i.e. the membrane or sack that contains the fish egg grains. (See Example 1 on page 8 of the specification.) The method has the following essential elements:

Starting material: Fish egg skin, per se (outer membrane that surround fish eggs)

Processing: combination of

treatment with ozonized water

+

treatment with one or more proteolytic enzymes.

None of the cited references, nor the combination thereof, teach or suggest each of the elements of Applicant’s claimed method.

The combination of treatment with ozonized water and treatment with one or more proteolytic enzymes results in the inhibition of denaturation or decomposition of the proteins, which is neither taught nor suggested by any of the cited documents. Applicant has discovered that it is absolutely essential to use the combination of the ozonized water treatment and treatment with one or more proteolytic enzymes for the production of

useful products, (e.g., with an advantageous amino acid composition containing high amounts of essential amino acids) from the fish egg skin (fish egg skin waste). Generally, fish egg skin produced during the processing of fish eggs is discarded as industrial wastes.

Applicant's claimed method results in unique characteristics and unexpected advantages, as discussed in paragraphs [0018] (including Table 2), [0019], [0023] and [0024] on pages 9, 10 and 12 of Applicant's Specification, as well as Fig. 1. Specifically, Table 2 compares the results from Example 1 (according to Applicant's invention), Reference Example (where a pretreatment with hot water is used in place of the ozone treatment) and a Mackerel extract. The amino acid components obtained from Example 1 are comprised of 17 different amino acids, and the content levels of the essential amino acids are remarkably higher than those from the Reference Example and the Mackerel extract. The high amino acid levels indicate that the denaturation or decomposition of the proteins is inhibited by treatment with ozone and that the proteins are nearly completely degraded by the enzymes. On the contrary, it appears that the low amino acid levels in the Reference Example and the Mackerel extract are due to the denaturation of proteins during the thermal treatment at 70°C or above.

JP '368 merely discloses a technique for removing or thinning the outer skin of fish eggs whereby roe materials are treated to provide fish egg particles utilizable as processed food materials. In this reference, the enzymatically digested fish egg skin products are thrown away, together with enzyme-containing waste liquids resulting from said treatments. Thus, in JP '368, a fish egg with a skin is treated to remove the skin. On the contrary, Applicant's amended claims require a method of processing roe grains surrounded by a fish egg skin to remove the roe grains, and treating the resulting fish egg skin to obtain amino acids and peptides.

Takasaki et al. disclose a technique for producing fish and shellfish extracts with various pharmaceutical actions wherein the flesh of fish, eaten as food, is subjected to enzymatic reaction. (In the prior art Working Example, the flesh of mackerel was used.)

Haraguchi et al. and Blinkovsky et al. (as well as JP '368) merely disclose general fish processing techniques.

None of the cited documents teach or suggest the concept for utilization of a fish egg skin, per se, as a useful material. Applicant's recited method produces amino acids and peptides which can be used in solutions or powders as a food supplement. Thus, Applicant's invention is environmentally advantageous because the fish egg skin, which is normally disposed of as industrial waste, is transformed into something useful. The cited documents fail to teach or suggest how to produce useful amino acid and lower molecular peptide-containing edible products from a fish egg skin.

The egg skin of fish is completely different from the flesh of fish when it is utilized as food. As stated previously, the egg skin of fish is generally thrown away as waste.

In the marine industries, including Japan and Korea, many fish egg products are processed. In Japan, tons of ovary sacs (fish egg skins) are produced via the production of fish caviars (fish eggs such as "Mentaiko" and "Ikura"). Therefore, tons of fish egg skin wastes are produced, which causes problems. Applicant has successfully solved these problems, by creating a method in which the fish egg skin is treated by the claimed method, and thus transformed into a useful product.

In the cited documents, edible parts of fish and shellfish are treated. On the contrary, in Applicant's invention, the part that is generally thrown away, the fish egg skin, is treated. In the marine product processing industry, the edible part of fish and shellfish is entirely distinctive from the outer membrane that surrounds fish eggs.

The content levels of essential amino acids in Example 1, according to Applicant's invention, are remarkably higher than those in the Reference Example and the mackerel extract, and the ACE inhibitory activity is nearly equivalent to that of the angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide mixture derived from edible sardines. These advantageous features of Applicant's invention are not taught or suggested by the cited documents.

Furthermore, the Assignee of the present application has started a new business with North Japan Chemical Co., Ltd. and Jinnai Shoten Co., Ltd, based on the techniques covered by this patent application. Please see Appendices 3 and 4, attached hereto.

For these reasons, the invention of claims 1 and 2 is clearly patentable over the cited references.

Therefore, in view of the foregoing amendments and remarks, it is submitted that the ground of rejection set forth by the Examiner has been overcome, and that the application is in condition for allowance. Such allowance is solicited.

If, after reviewing this Amendment, the Examiner feels there are any issues remaining which must be resolved before the application can be passed to issue, the Examiner is respectfully requested to contact the undersigned by telephone in order to resolve such issues.

Respectfully submitted,

Kunihiko KODAKA

By: Warren M. Cheek, Jr.
Warren M. Cheek, Jr.
Registration No. 33,367
Attorney for Applicant

WMC/AES/nrj
Washington, D.C. 20006-1021
Telephone (202) 721-8200
Facsimile (202) 721-8250
June 7, 2007

APPENDIX 1

1/E

受領書

平成18年10月 5日
特許庁長官

識別番号
氏名(名称)

100069903
幸田 全弘

様

以下の書類を受領しました。

項番	書類名	整理番号	受付番号	提出日	出願番号通知(事件の表示)
1	特許願	PK061278	50601943372	平18.10. 5	特願2006-274174 以上

整理番号: PK061278 特願2006-274174 (Proof) 提出日: 平成18年10月 5日 1/E

【書類名】 特許願
【整理番号】 PK061278
【提出日】 平成18年10月 5日
【あて先】 特許庁長官 中嶋 誠 殿
【国際特許分類】 A61K 35/60
【発明者】
 【住所又は居所】 福岡市東区香椎浜1丁目7番1-901号
 【氏名】 小▲高▼ 邦彦
【発明者】
 【住所又は居所】 札幌市北区篠路3条6丁目5番1-103号
 【氏名】 盛 孝男
【発明者】
 【住所又は居所】 福岡市東区若宮4丁目14-48
 【氏名】 船津 軍喜
【発明者】
 【住所又は居所】 福岡市東区名島5丁目31番17号
 【氏名】 藤野 武彦
【特許出願人】
 【識別番号】 396006697
 【住所又は居所】 福岡市東区香椎浜1丁目7番1-901号
 【氏名又は名称】 有限会社 フジ・バイオ研究所
【特許出願人】
 【識別番号】 304030486
 【住所又は居所】 北海道札幌市厚別区厚別南5丁目1番7号
 【氏名又は名称】 北日本化学株式会社
【特許出願人】
 【識別番号】 599035339
 【住所又は居所】 福岡県糟屋郡久山町大字久原2241-1
 【氏名又は名称】 株式会社 レオロジー機能食品研究所
【代理人】
 【識別番号】 100069903
 【住所又は居所】 東京都港区新橋4丁目24番11号 中村ビル5階 幸田国際特許事務所
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 幸田 全弘
 【電話番号】 03-3436-3940
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 011763
 【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0104969

整理番号: PK061278 特願2006-274174 (Proof) 提出日: 平成18年10月 5日 1/E

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

魚卵外皮の収縮蛋白の分解物であるアミノ酸およびペプチドからなり、
膵臓および肝臓機能低下抑制作用を有すること
を特徴とする薬効性組成物。

【請求項 2】

前記アミノ酸およびペプチドが、
オゾン水処理した魚卵外皮を、バチルス属が産生する蛋白分解酵素で分解して得られた
ものであること
を特徴とする請求項 1 に記載の薬効性組成物。

【請求項 3】

前記魚卵外皮が、
鱈、ニシン、鮭の腹子外皮であること
を特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の薬効性組成物。

整理番号: PK061278 特願2006-274174 (Proof) 提出日: 平成18年10月 5日

1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 薬効性組成物

【技術分野】

【0001】

この発明は、鰯、ニシン、鮭などの腹子外皮の、収縮蛋白の分解物であるアミノ酸およびペプチドからなる薬効性を有する組成物に関するものであって、健康食品の原料として、さらには、各種疾病の予防又は治療用の医薬として使用される可能性の高いもので、それらの健康食品調製、医薬調製技術に関するものである。

【背景技術】

【0002】

水産加工に伴い発生し廃棄される、魚体の魚肉、魚皮、魚骨などは、魚粉、魚油、畜産用飼料、農業用肥料等に加工し利用されているが、魚卵の加工ならびに水産加工により発生する魚卵外皮については、ほとんどが産業廃棄物として処分されてきていた。

【0003】

すなわち、魚肉に関しては、魚介類を高温処理し、魚介類に含まれている自己分解酵素を不活化した後、枯草菌産生蛋白分解酵素および麹菌産生蛋白分解酵素により、成分中の蛋白をペプチドおよびアミノ酸に分解して、抗潰瘍作用、インシュリン様作用、高脂血症治療作用等の医薬効果を有する魚介類エキスを得ることが、特許文献1に報告されている。

また、魚皮、魚骨、魚鱗等に関しては、魚皮、魚骨を蛋白質分解酵素による処理などにより得られたゼラチンを食品素材として利用する方法が特許文献2において、さらに、魚鱗や魚皮から抽出したコラーゲンを医療用生体材料あるいは化粧品材料などとして利用する方法等特許文献3および4において提案されている。

【0004】

これらに対して、魚卵外皮に関しては、その成分が、筋原線維蛋白質である収縮蛋白質（ミオシン）であるにもかかわらず、その有効利用についての提案は、長い間なされることがなかった。

【0005】

ところが、最近になって、小高によって、魚卵外皮を構成する収縮蛋白質（ミオシン）を分解する方法が提案されている。

その方法によれば、種々の必須アミノ酸とペプチドを含む組成物が得られ、この組成物は、各種食品の栄養強化のための食品強化剤として、また、ペプチドを含み、ACE阻害活性を有し、生理活性物質として有用であることが、特許文献5に報告されている。

【特許文献1】 特公平1-14885号公報（特許請求の範囲）

【特許文献2】 特開平10-276680号公報（特許請求の範囲）

【特許文献3】 特開平5-93000号公報（特許請求の範囲）

【特許文献4】 特開2000-50811号公報（特許請求の範囲）

【特許文献5】 特許3691497号公報（特許請求の範囲）

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

小高の提案する方法は、産業廃棄物として処分されていた魚卵外皮を有効利用するもので、環境汚染防止の面からも、極めて有意義なものであるが、その前提として、小高の提案する方法で得られた、アミノ酸およびペプチドを含む組成物が幅広く活用されることが必要である。

【0007】

そこで、発明者は、上記方法を活用し、廃棄物として処分されていた魚卵外皮を、社会的にも、産業的にも有益なものにするために、前記組成物の特性を検討し、その特性を利用して、前記組成物の有効利用を図るべく検討を行った。

整理番号: PK061278 特願2006-274174 (Proof) 提出日: 平成18年10月 5日 2

【0008】

その結果、発明者は、前記組成物が、膵臓および肝臓機能低下抑制作用を有することを見出し、その特性に基づいて、前記組成物が、健康食品や医薬の調製に有用なものであることを見出して、この発明を完成させたものである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

すなわち、この発明の請求項1に記載の発明は、魚卵外皮の収縮蛋白の分解物であるアミノ酸およびペプチドからなり、膵臓および肝臓機能低下抑制作用を有することを特徴とする薬効性組成物である。

【0010】

また、この発明の請求項2に記載の発明は、請求項1に記載の薬効性組成物において、前記アミノ酸およびペプチドが、オゾン水処理した魚卵外皮を、パチルス属が産生する蛋白分解酵素で分解して得られたものであること、を特徴とするものである。

【0011】

さらに、この発明の請求項3に記載の発明は、請求項1又は2に記載の薬効性組成物において、前記魚卵外皮が、鱈、ニシン、鮭の腹子外皮であること、を特徴とするものである。

【発明の効果】

【0012】

この発明の薬効性組成物は、膵臓および肝臓機能低下抑制作用を有するもので、健康食品の素材として、また、医薬の原料として、有効に利用されるものであって、かつ、産業廃棄物として処分されていた魚卵外皮を有効利用するもので、環境汚染の上からも、優れた効果を有するものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

この発明の薬効性組成物は、魚卵外皮の収縮蛋白の分解物であるアミノ酸およびペプチドからなるものである。

その調製方法としては、特許文献5記載の方法が挙げられ、その方法では、分解物は、以下の様に調製される。

【0014】

すなわち、魚卵外皮の収縮蛋白の分解物であるアミノ酸およびペプチドは、魚卵外皮を冷水で洗浄し、洗浄後、好ましくは室温以下のオゾン水で処理する。

低温のオゾン水での処理により、付着細菌の除菌及び脱脂肪等が行なわれ、さらに、構成蛋白である筋原線維蛋白の収縮蛋白質（ミオシン）の変性が防止される。

その結果として、格別精製を行なうことなく、後工程の酵素分解反応により、溶液として、また、当該溶液を濃縮・乾燥することにより、食品用の栄養強化剤や健康食品の素材として、また医薬の原料として利用することができるアミノ酸およびペプチドを粉末として得ることができる。

【0015】

オゾン水処理は、洗浄、脱水した魚卵外皮を、冷水を入れたタンク中で攪拌しながら、オゾン発生装置から、オゾン濃度0.2～10ppm/Lで供給し、5～30分間室温以

整理番号:PK061278 特願2006-274174 (Proof) 提出日:平成18年10月 5日 3

下で処理される。

魚卵外皮が分散状態で存在しているオゾン処理液は、溶存しているオゾンを消失させるために、攪拌しながら酵素反応温度35～50℃付近まで加温される。

【0016】

オゾンが消失した後、バチルス属 (*Bacillus subtilis*) の産生する蛋白分解酵素により、収縮蛋白質 (ミオシン) を分解する。

この分解液に、直接あるいは分解液中の酵素を温度80℃以上に加温し、15分間以上攪拌し酵素を失活させた後、糸状菌 (*Aspergillus oryzae*) の産生する蛋白分解酵素を用いて、さらに低分子化と他種類の魚卵蛋白に由来する苦味やアミノ酸臭等の分解処理を行なう。

この両酵素による処理は、魚卵外皮に対し、0.02～0.2重量%の酵素を用いて、攪拌の下、処理温度35～55℃、処理時間2～5時間、いずれもほぼ同じ条件で行なわれる。

【0017】

酵素処理を終えた処理液は、酵素を失活させた後、800メッシュの濾布を用いた遠心分離により固形物を、さらに限外濾過法によりコロイド状不純物を除去する。

得られたアミノ酸およびペプチドを含む濾液は、使用目的により、そのままの状態で、あるいは適度の濃度に濃縮して、液状で利用することができる。

アミノ酸およびペプチドを粉末として得る場合は、濾液を常圧乾燥、減圧乾燥、噴霧乾燥、凍結乾燥法などにより、成分の分解を極力回避する観点から、水分を速やかに除去することが望ましい。

かかる観点から、乾燥方法としては、減圧乾燥法あるいは噴霧乾燥法が適している。

また、乾燥温度についても、温度130℃以下で行うことが望ましく、この温度を超えると有効成分の分解が始まり、品質の低下を招く。好ましい乾燥温度は70～130℃である。

【0018】

このようにして得られた魚卵外皮の収縮蛋白の分解物には、ペプチドおよび各種のアミノ酸が含まれ、蛋白分解酵素、特に、バチルス属 (*Bacillus subtilis*) の産生する蛋白分解酵素の使用量が少ない場合 (0.05重量%以下)、ペプチドが多く含まれた組成物が得られる。

【0019】

この分解物は、種々のアミノ酸とペプチドを含有する組成物で、食品に栄養強化を目的に補助添加剤として用いられる他、後述する特性を有するものである。健康食品の素材として、また、医薬の原料として、有効に利用されるものである。

【実施例】

【0020】

＜組成物の調製＞

明太子の卵粒が除かれた魚卵外皮5kgを、洗浄槽で冷水20Lで3回洗浄し、籠型遠心脱水装置で脱水した。

酵素分解タンク (5L) 内に脱水魚卵外皮1.5kgと冷水4.5Lを入れ、攪拌しながらオゾン発生装置 ((株) ジャール・400型) から、オゾンを濃度0.5ppm/Lで供給し、10分間、温度約10℃のオゾン水で処理を行なった後、溶存するオゾンを消失させるため、攪拌を行ないながら酵素反応温度付近まで加温した。

つぎに、この処理液に、温度約45℃で筋原線維蛋白である収縮蛋白 (ミオシン) を分解するため、バチルス属 (*Bacillus subtilis*) が産生する蛋白分解酵素 (ヤクルト薬品 (株) ・アロアーゼAP-10) を、乾燥魚卵外皮換算で0.2重量%添加し、約2.5時間攪拌処理して収縮蛋白 (ミオシン) を分解した。

【0021】

さらに、この分解液に、糸状菌 (*Aspergillus oryzae*) が産生する蛋白分解酵素 (ヤク

整理番号:PK061278 特願2006-274174 (Proof) 提出日:平成18年10月 5日 4

ルト薬品・パンチダーゼNP-2)を、魚卵外皮換算で0.2重量%添加し、同温度で、同時間攪拌処理して、魚卵外皮が持つ魚肉蛋白等に由来する苦味成分や、アミノ酸臭等を分解除去し、さらに低分子化を行った。

上記2種の蛋白分解酵素で酵素分解を行った後、処理液を液温80℃に加温し、残留酵素の失活並びに滅菌処理を行った。

【0022】

失活処理した分解液(液温・60℃)を、定量ポンプで噴霧乾燥装置に時間当たり200mL供給し、乾燥入口熱風温度130℃、乾燥出口熱風温度70℃で乾燥を行い、含水率7%以下の乾燥魚卵外皮由来の、各種アミノ酸およびペプチドを含有する組成物を粉末として得た。

【0023】

<安全性試験>

得られた組成物をラットに投与し、その毒性を以下のように試験した。

1. 試験方法

(1) 試験動物

6週齢の雄、雌のWistar系SPFラット(平均体重、雄226.4g、雌160.0g、(株)ケーピーティーオリエンタルより購入)を、それぞれ12匹使用し、雌雄別にI~IVの4群(n=6)に割り付けた。

(2) 飼育方法

室温(23±2℃)、相対湿度50~60%、12時間の明暗サイクル(7:00~19:00)の環境下で、個別のステンレスケージを用いて飼育した。

固形飼料MF(オリエンタル(株)製)と飲水は、自由摂取とした。

(3) 投与方法

組成物を蒸留水にて溶解し、II群(雄ラット)、IV群(雌ラット)のラットに一匹当たり2.5g/kgを、胃ゾンデを用いて単回投与し、投与2週間後に屠殺した。

なお、I群(雄ラット)、III群(雌ラット)のラットには、同量の蒸留水を投与した。

また、試験期間中の飼料摂取量は、毎日測定した。

(4) 観察項目

イ. 体重

ロ. 解剖前の呼吸状態、痙攣、毛並み、皮膚、糞

ハ. 解剖時の内臓状態

ニ. 血液生化学検査

(5) 屠殺方法

2週間の組成物投与終了後に、エーテルおよびネンブタール(大日本製薬(株)製)麻酔下で開腹し、腹大動脈から採血した。解剖時は、8週齢であった。

【0024】

<安全性試験結果>

血液生化学検査の結果を示した表1、表2を含め、試験結果は以下の通りである。

この発明の組成物には毒性がなく、安全性には問題が認められなかった。

むしろ、肝機能(LDH、アルカリフォスファターゼ、γ-GTP)が改善され、後述のSTZ(ストレプトゾトシン)投与試験の結果と併せると、この発明の組成物は、積極的抗毒性作用を持つことが示唆された。

(1) 一般状態および経口死亡

対照群と組成物投与群のどちらにも、運動、呼吸状態、痙攣、毛並み、皮膚、糞の異常は認められなかった。

また、経口による死亡も認められなかった。

(2) 体重

順調な体重推移を示し、いずれの測定日にも、対照群と組成物投与群との間に有意差は認められなかった。

(3) 内臓状態

整理番号: PK061278 特願2006-274174 (Proof) 提出日: 平成18年10月 5日 5

いずれの群にも異常はなく、対照群と組成物投与群との間に、有意差は認められなかった。また、肝重量も同様であった。

(4) 血液生化学

表1および表2に示したように、組成物投与群の雄では、LDH、アルカリフォスファターゼ、 γ -GTPで対照群に比し有意に低値を示し、雌でもLDHにおいて、有意な低下を示した。

【0025】

【表1】

検査項目	正常対照群 (I群:雄) 平均値±標準偏差	薬剤投与群 (II群:雄) 平均値±標準偏差	P値
総蛋白 (g/dl)	5.20±0.30	5.13±0.15	0.64
アルブミン (g/dl)	3.95±0.19	3.90±0.14	0.61
A/G比	3.20±0.40	3.18±0.28	0.90
AST (IU/l)	118.83±20.89	95.50±27.02	0.13
ALT (IU/l)	27.33±1.51	26.17±9.92	0.51
LDH (IU/l)	1878.0±663.1	879.7±556.3	0.02
アルカリフォスファターゼ (IU/l)	508.17±81.74	427.87±35.47	0.05
γ -GTP (IU/l)	6.50±0.55	5.50±0.55	0.01
総ビリルビン (mg/dl)	0.20±0.00	0.20±0.00	1.00
総コレステロール (mg/dl)	61.83±10.21	56.39±5.32	0.27
HDLコレステロール (mg/dl)	44.17±7.31	41.17±3.19	0.38
HDL-cho/T-cho	0.72±0.04	0.73±0.04	0.47
LDLコレステロール (mg/dl)	11.50±3.62	11.17±2.14	0.85
中性脂肪 (mg/dl)	41.17±13.27	33.00±14.78	0.34
尿素窒素 (mg/dl)	19.23±2.55	17.17±1.79	0.14
クレアチニン (mg/dl)	0.23±0.08	0.25±0.08	0.73
尿酸 (mg/dl)	1.40±0.81	1.12±0.47	0.48
Na (mEq/l)	144.33±0.82	142.67±1.37	0.03
K (mEq/l)	4.09±0.47	3.63±0.31	0.11
Cl (mEq/l)	102.50±0.84	103.50±1.22	0.13
Ca (mEq/l)	10.73±0.25	10.35±0.33	0.05
CPK (IU/l)	1393.7±565.5	1182.7±1372.4	0.73
アミラーゼ (IU/l)	639.50±112.54	598.17±75.73	0.47
血糖 (mg/dl)	144.67±18.32	144.83±24.48	0.99
CRP (mg/dl)	0.01±0.00	0.01±0.00	
屠殺時体重 (g)	433.30±32.10	356.40±17.17	

【0026】

整理番号: PK061278 特願2006-274174 (Proof) 提出日: 平成18年10月 5日

6

【表2】

検査項目	正常対照群 (Ⅲ群: 雌) 平均値±標準偏差	薬剤投与群 (Ⅳ群: 雌) 平均値±標準偏差	P値
総蛋白 (g/dl)	5.89±0.21	5.30±0.17	0.77
アルブミン (g/dl)	4.32±0.12	4.20±0.22	0.28
A/G比	4.29±0.43	3.74±0.58	0.08
AST(IU/l)	110.67±23.94	86.67±10.41	0.05
ALT(IU/l)	20.83±2.93	21.17±1.72	0.81
LDH(IU/l)	1511.2±547.7	683.5±333.6	0.02
アルカリフォスファターゼ (IU/l)	376.17±98.82	303.00±65.03	0.16
γ-GTP (IU/l)	4.83±1.60	3.67±1.03	0.16
総ビリルビン (mg/dl)	0.20±0.00	0.18±0.04	0.34
総コレステロール (mg/dl)	41.17±8.04	46.00±13.80	0.48
HDLコレステロール (mg/dl)	35.00±5.48	38.50±10.71	0.49
HDL-cho/T-cho	0.86±0.04	0.84±0.04	0.62
LDLコレステロール (mg/dl)	5.33±1.63	6.33±2.73	0.46
中性脂肪 (mg/dl)	8.83±3.06	12.83±4.92	0.12
尿素窒素 (mg/dl)	18.35±2.01	17.28±2.13	0.39
クレアチニン (mg/dl)	0.27±0.05	0.22±0.04	0.09
尿酸 (mg/dl)	1.02±0.21	0.98±0.18	0.78
Na(mEq/l)	143.67±1.21	142.33±1.37	0.10
K(mEq/l)	3.55±0.96	3.40±0.24	0.41
Cl (mEq/l)	103.83±0.98	103.67±1.63	0.83
Ca(mEq/l)	10.20±0.17	10.35±1.63	0.17
CPK(IU/l)	988.7±355.0	938.7±425.1	0.83
アミラーゼ (IU/l)	250.17±65.82	358.83±184.95	0.20
血糖 (mg/dl)	93.00±18.64	108.00±20.49	0.21
CRP (mg/dl)	0.01±0.00	0.01±0.00	
屠殺時体重 (g)	367.12±34.09	367.12±34.09	

【0027】

<生体での機能測定>

この発明の薬効性組成物の生体に与える影響について、糖尿病モデルラットを用い、以下のように試験した。

1. 試験方法

(1) 試験動物

8週齢の雄、雌のWistar系SPFラット（平均体重、雄267.2g、(株)ケービーティーオリエンタルより購入）を24匹使用し、8匹づつ、I～IIIの3群に割り付けた。

(2) 飼育方法

室温（23±2℃）、相対湿度50～60%、12時間の明暗サイクル（7:00～19:00）の環境下で、個別のステンレスケージを用いて飼育した。

固形飼料MF（オリエンタル（株）製）と飲水は、自由摂取とした。

(3) 投与方法

整理番号: PK061278 特願2006-274174 (Proof) 提出日: 平成18年10月 5日 7

組成物を蒸留水にて溶解し、III群のラットに、1匹当たり1日1回0.75g(飼料30g中2.5%相当)を、胃ゾンデを用いて連続投与し、組成物投与後5日後にSTZ(35mg/kg)を飽食時に腹腔内投与した。

STZ投与後、組成物を引き続き平日のみ3週間連続投与した。

なお、I群、II群には同量の蒸留水を胃ゾンデを用いて投与した。

試験期間中飼料と飲水は、自由摂取させ、飼料摂取量は平日のみ毎日測定した。

(4) 糖尿病モデルの作製

組成物投与5日後にII群のラットに、STZ(35mg/kg)を飽食時に腹腔内投与した。

投与時は、エーテル麻酔をかけた。

(5) 観察項目

イ. 体重

ロ. 血糖値

エーテル麻酔下で尾静脈から採血し、グルテストエース((株)三和科学研究所製)を用いて測定した。

ハ. 血液検査

採血した血液から得られた血清で生化学検査を行った。

なお、検査は(株)CRCおよび日本バイオリサーチセンターに委託した。

(6) 屠殺方法

4週間の組成物投与終了後に、エーテルおよびネンブタール(大日本製薬(株)製)麻酔下で開腹し、腹大動脈から採血した。

解剖時は13週齢であった。

【0028】

<生体機能検査結果>

血液生化学検査の結果を示した表3を含め、試験結果は以下のとおりである。

STZという高度の酸化剤の投与されたII群(DM対照群)のラットは、脾臓のみならず(高血糖)肝機能の種々の低下が認められる。

これに対し、この発明の組成物(薬剤)の投与されたIII群(薬剤投与群)のラットは、STZが投与されているにもかかわらず、脾機能低下、肝機能低下が抑制されており、この発明の組成物が抗毒性効果を有することが示されている。

(1) 一般状態および経口死亡

いずれの群にも異常はなく、経口死亡は認められなかった。

(2) 剖検

組成物投与群のラット1匹に、胃と小腸に消化管出血が認められ、その他に異常は認められなかった。

(3) 血液生化学

組成物(薬剤)投与群と、正常対照群との間に有意差は認められなかった。

しかしながら、DM対照群と比較すると、血糖、AST、ALT、LDHで増大が抑制される傾向が、総蛋白、HDL、体重で減少を抑制する傾向が認められた。

【0029】

整理番号: PK061278 特願2006-274174 (Proof) 提出日: 平成18年10月 5日

8/E

【表 3】

検査項目	I 群: 正常対照群 平均値±標準偏差	II 群: DM対照群 平均値±標準偏差	III 群: 薬剤投与群 平均値±標準偏差
総蛋白 (g/dl)	5.90±0.42	5.77±0.27	5.89±0.45
アルブミン (g/dl)	4.04±0.32	4.01±0.18	4.01±0.25
A/G比	2.13±0.25	2.29±0.17	2.17±0.23
AST (IU/l)	101.00±22.26	224.00±262.63	124.71±42.39
ALT (IU/l)	39.57±5.32	91.57±127.94	48.57±15.61
LDH (IU/l)	717.29±369.96	904.57±438.92	685.71±309.46
アルカリフォスファターゼ (IU/l)	585.43±132.44	513.57±85.26	571.71±64.76
γ-GTP (IU/l)	3.00±0.00	3.00±0.00	3.00±0.00
総ビリルビン (mg/dl)	0.10±0.00	0.10±0.00	0.10±0.00
総コレステロール (mg/dl)	72.86±11.87	70.57±7.55	79.43±13.50
HDLコレステロール (mg/dl)	51.57±10.95	45.86±6.41	54.00±10.88
HDL-cho/T-cho	0.68±0.05	0.65±0.08	0.67±0.05
LDLコレステロール (mg/dl)	9.14±2.19	11.00±2.31	10.14±2.67
中性脂肪 (mg/dl)	145.00±64.53	138.86±60.11	152.43±64.81
尿素窒素 (mg/dl)	25.42±2.59	26.70±3.25	27.14±2.00
クレアチニン (mg/dl)	0.21±0.04	0.23±0.08	0.21±0.04
尿酸 (mg/dl)	1.06±0.28	0.87±0.31	1.03±0.30
Na (mEq/l)	143.14±1.57	142.86±1.86	144.57±5.65
K (mEq/l)	4.70±0.34	4.51±0.29	4.74±0.32
Cl (mEq/l)	103.43±1.40	103.00±1.29	105.14±4.22
Ca (mEq/l)	11.33±0.44	11.31±0.43	11.19±0.81
CPE (IU/l)	1396±1060	1703±960	1351±622
アミラーゼ (IU/l)	904.57±101.54	924.57±139.00	987.86±190.09
インスリン (ng/ml)	2.91±1.43	2.87±1.34	3.23±0.63
血糖 (mg/dl)	152.57±21.47	167.29±29.77	184.86±30.19
血糖/インスリン	60.37±23.68	66.80±25.51	58.84±13.46
尾静脈血糖 (mg/dl)	118.86±19.43	142.57±24.37	140.29±32.50
CRP (mg/dl)	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
屠殺時体重 (g)	467.29±33.99	456.17±22.04	473.64±27.48

【産業上の利用可能性】

【0030】

この発明の薬効性組成物は、上記のような優れた特性を有し、かつ毒性を有するものではないので、健康食品産業や医薬業界で、それらの原料として、広く利用される可能性の高いものである。

整理番号: PK061278 特願2006-274174 (Proof) 提出日: 平成18年10月 5日 1/E

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 廃棄物として処分されていた魚卵外皮を、社会的にも、産業的にも有益なものにするために、その分解物の特性を検討し、その特性を利用して、前記組成物の有効利用を図ることを目的とする。

【解決手段】 鰯、ニシン、鮭の腹子外皮の、収縮蛋白の分解物、特に、バチルス属が産生する蛋白分解酵素による分解物であるアミノ酸およびペプチドを、脾臓および肝臓機能低下抑制作用を有する薬効性組成物とし、健康食品や医薬の原料として利用し、廃棄物とされていた魚卵外皮の再利用の道を広げるものである。

【選択図】 なし

English translation (Excerpt) of Appendix 1

Japanese Patent Application No. 2006-274174

Filing Date: October 5, 2006

Inventors:

Kunihiko KODAKA of 7-1-901, Kashiama 1-chome, Higashi-ku,
Fukuoka-shi, Fukuoka, Japan

et al.

Applicants:

Fuji Bio Technology Institute Co., Ltd. of
7-1-901, Kashiama 1-chome, Higashi-ku,
Fukuoka-shi, Fukuoka, Japan

et al.

Title of the Invention:

Medicinal compositions

Examples

[0020]

<Preparation of compositions>

Roe sac materials (fish egg skin samples; 5 kg) obtained by removing egg grains from "MENTAIKO" (the ovaries of Alaska pollock) were washed with 20 L of cold water three times in a washing bath and then dehydrated with a basket-type dehydration centrifuge.

A mixture of the dehydrated roe sac material (1.5 kg) and cold water (4.5 L) were placed in an enzymatic hydrolysis tank (5 L), and then treated with about 10°C ozonized water for 10 min under stirring while ozone was supplied to the enzymatic hydrolysis tank at 0.5 ppm/L from an ozonizer (Type 400, Jarre K.K.). Then, the mixture was warmed to near the enzymatic reaction temperature while stirring for making dissolved ozone disappear.

To the resultant treated solution was then added protease (AROASE AP-10, Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.) produced by Bacillus subtilis at 0.2 % by weight based on the weight of the dried roe sac for degradation (at about 45°C) of contractile protein, myosin, composing myofibril proteins. The resulting mixture was stirred for about 2.5 hours at about 45°C to degrade contractile protein, myosin.

[0021]

Further, to this decomposition solution was added protease (PANCIDASE NP-2, Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.) produced by Aspergillus oryzae at 0.2 % by weight based on the weight of the roe sac. The resulting mixture was stirred at about 45°C for about 2.5 hr to decompose/remove components with bitter taste and/or amino acid odor, derived from fish meat proteins retained in the roe sac, with reduction of molecular sizes.

After enzymatically hydrolyzing with the above-mentioned two proteolytic enzymes, the treated solution was warmed up to 80°C to inactivate the remaining enzymes and perform sterilization.

[0022]

The inactivated hydrolysis solution (solution temperature: 60°C) was supplied to a spray dryer with a metering pump at a rate of 200 mL/hr and dried at a dryer inlet hot air temperature of 130°C and at a dryer outlet hot air temperature of 70°C to give, as a powder product, a composition with a water content of 7% or less, composed of various amino acids and peptides derived from the dried roe sac.

[0023]

<Safety tests>

The resulting composition was administered to rats, and tested for the toxicity as follows:

1. Test procedures

(1) Test animal

Six-week old Wistar strain SPF male and female rats (12 male rats and 12 female rats; average body weight, male: 226.4 g, and female: 160.0 g, purchased from KBT Oriental Co., Ltd., JP) were used, and the male and female rats were separately divided into four groups I to IV (n = 6).

(2) Feeding method

The rats were housed in an environment maintained at room temperature ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) with 50 to 60% relative humidity and a 12 hr light/dark cycle (7:00 to 19:00) in individual stainless steel cages.

Animals were given free access to solid feed MF (Oriental Yeast Co., Ltd.) and drinking water.

(3) Administration method

The composition was dissolved in distilled water. Rats (group II: male rats and group IV: female rats) received a single administration of the composition at a dose of 2.5 g/kg body weight with a gastric tube. Two weeks later, the rats were sacrificed.

Rats (group I: male rats and group III: female rats) received an administration of distilled water at the same dosage level.

Each rat was measured daily for the amount of feed intake during a test period.

(4) Examination items

- i. body weight
- ii. respiratory conditions, convulsion, hair, skin, and feces before dissection
- iii. internal organ conditions during dissection
- iv. blood biochemical tests

(5) Sacrifice method

At two weeks after completion of the composition administration, the rats were laparotomized under anesthesia with

ether and Nembutal (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) and the blood was collected from abdominal aorta. The rats were 8-week old when the dissection was performed.

[0024]

<Safety test results>

The examination results, including the blood biochemical test results shown in Tables 1 and 2, are as follows:

No toxicity associated with the composition according to the present invention was observed. Thus, the composition was non-toxic.

Hepatic functions (LDH, alkaline phosphatase, and γ -GTP) were rather improved. The combination of these data and the STZ (streptozotocin) administration test results described below suggests that the composition according to the present invention has an antitoxic action.

(1) General conditions and death when given orally

No abnormality in physical activities, respiratory conditions, convulsion, hair, skin, and feces was observed in both the control groups and the composition administered groups.

In addition, no death was observed after the oral administration.

(2) Body weight

Body weights increased favorably. No significant difference between the control groups and the composition administered groups was observed in each measurement day.

(3) Internal organ conditions

No abnormality of the internal organ conditions was observed in all groups, and no significant difference between the control groups and the composition administered groups. In addition, the

same was applicable to the liver weight.

(4) Blood biochemical tests

As shown in Tables 1 and 2, the LDH, alkaline phosphatase, and γ -GTP levels of the composition administered group male rats were significantly low compared to those of the control group. Even in the female rat group, the value of LDH was significantly low.

[0025]

Table 1

Test Item	Normal Control Group (Group I: male) Means \pm S. D.	Agent-administered Group (Group II: male) Means \pm S. D.	P value
Total protein (g/dL)	5.20 \pm 0.30	5.13 \pm 0.15	0.64
Albumin (g/dL)	3.95 \pm 0.19	3.90 \pm 0.14	0.61
A/G ratio	3.20 \pm 0.40	3.18 \pm 0.28	0.90
AST (IU/L)	118.83 \pm 20.89	95.50 \pm 27.02	0.13
ALT (IU/L)	27.33 \pm 1.51	26.17 \pm 3.92	0.51
LDH (IU/L)	1878.0 \pm 663.1	879.7 \pm 556.3	0.02
Alkaline phosphatase (IU/L)	508.17 \pm 81.74	427.67 \pm 35.47	0.05
γ -GTP (IU/L)	6.50 \pm 0.55	5.50 \pm 0.55	0.01
Total bilirubin (mg/dL)	0.20 \pm 0.00	0.20 \pm 0.00	1.00
Total cholesterol (mg/dL)	61.83 \pm 10.21	56.33 \pm 5.32	0.27
HDL cholesterol (mg/dL)	44.17 \pm 7.31	41.17 \pm 3.19	0.38
HDL-cho/T-cho	0.72 \pm 0.04	0.73 \pm 0.04	0.47
LDL cholesterol (mg/dL)	11.50 \pm 3.62	11.17 \pm 2.14	0.85
Triglyceride (mg/dL)	41.17 \pm 13.27	33.00 \pm 14.78	0.34
Urea nitrogen (mg/dL)	19.23 \pm 2.55	17.17 \pm 1.79	0.14
Creatinine (mg/dL)	0.23 \pm 0.08	0.25 \pm 0.08	0.73
Uric acid (mg/dL)	1.40 \pm 0.81	1.12 \pm 0.47	0.48
Na (mEq/L)	144.33 \pm 0.82	142.57 \pm 1.37	0.03
K (mEq/L)	4.03 \pm 0.47	3.63 \pm 0.31	0.11
Cl (mEq/L)	102.50 \pm 0.84	103.50 \pm 1.22	0.13
Ca (mEq/L)	10.73 \pm 0.25	10.35 \pm 0.33	0.05
CPK (IU/L)	1393.7 \pm 565.5	1182.7 \pm 1372.4	0.73
Amylase (IU/L)	639.50 \pm 112.54	598.17 \pm 75.73	0.47
Blood glucose (mg/dL)	144.67 \pm 18.32	144.83 \pm 24.48	0.99
CRP (mg/dL)	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	
Body weight at sacrifice (g)	433.30 \pm 32.10	356.40 \pm 17.17	

[0026]

Table 2

Test Item	Normal Control Group (Group III: female) Means \pm S.D.	Agent-administered Group (Group IV: female) Means \pm S.D.	P value
Total protein (g/dL)	5.33 \pm 0.21	5.30 \pm 0.17	0.77
Albumin (g/dL)	4.32 \pm 0.12	4.20 \pm 0.22	0.28
A/G ratio	4.29 \pm 0.43	3.74 \pm 0.56	0.08
AST (IU/L)	110.67 \pm 23.94	86.67 \pm 10.41	0.05
ALT (IU/L)	20.83 \pm 2.93	21.17 \pm 1.72	0.81
LDH (IU/L)	1511.2 \pm 547.7	683.5 \pm 333.6	0.02
Alkaline phosphatase (IU/L)	376.17 \pm 98.82	303.00 \pm 65.03	0.16
γ -GTP (IU/L)	4.83 \pm 1.60	3.67 \pm 1.03	0.16
Total bilirubin (mg/dL)	0.20 \pm 0.00	0.18 \pm 0.04	0.34
Total cholesterol (mg/dL)	41.17 \pm 8.04	46.00 \pm 13.80	0.48
HDL cholesterol (mg/dL)	35.00 \pm 5.48	38.50 \pm 10.71	0.49
HDL-cho/T-cho	0.86 \pm 0.04	0.84 \pm 0.04	0.62
LDL cholesterol (mg/dL)	5.33 \pm 1.63	6.33 \pm 2.73	0.46
Triglyceride (mg/dL)	8.83 \pm 3.06	12.83 \pm 4.92	0.12
Urea nitrogen (mg/dL)	18.35 \pm 2.01	17.28 \pm 2.13	0.39
Creatinine (mg/dL)	0.27 \pm 0.05	0.22 \pm 0.04	0.09
Uric acid (mg/dL)	1.02 \pm 0.21	0.98 \pm 0.18	0.78
Na (mEq/L)	143.67 \pm 1.21	142.33 \pm 1.37	0.10
K (mEq/L)	3.55 \pm 0.36	3.40 \pm 0.24	0.41
Cl (mEq/L)	103.83 \pm 0.98	103.67 \pm 1.63	0.83
Ca (mEq/L)	10.20 \pm 0.17	10.35 \pm 1.63	0.17
CPK (IU/L)	988.7 \pm 355.0	938.7 \pm 425.1	0.83
Amylase (IU/L)	250.17 \pm 65.82	358.83 \pm 184.95	0.20
Blood glucose (mg/dL)	93.00 \pm 18.64	108.00 \pm 20.49	0.21
CRP (mg/dL)	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	
Body weight at sacrifice (g)	367.12 \pm 34.09	367.12 \pm 34.09	

[0027]

<In vivo function analysis>

The efficacy of the medicinal composition according to the present invention on living bodies was investigated with diabetes model rats as follows:

1. Test procedures

(1) Test animal

Eight-week old Wistar strain SPF male and female rats (24 animals, average body weight, male: 267.2 g, purchased from KBT Oriental Co., Ltd.) were divided into three groups I to III (n = 8).

(2) Feeding method

The rats were housed in an environment maintained at room temperature ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) with 50 to 60% relative humidity and a 12 hr light/dark cycle (7:00 to 19:00) in individual stainless steel cages.

Animals were given free access to solid feed MF (Oriental Yeast Co., Ltd.) and drinking water.

(3) Administration method

The composition was dissolved in distilled water, and administered to each group III rat with a gastric tube once a day at a dose of 0.75 g (equivalent to 2.5% of 30g of the feed) for consecutive 5 days. After the administration for 5 days, STZ (35 mg/kg) was intraperitoneally administered to the rats at satiation.

After the STZ administration, the composition was administered to the rats on weekdays only for consecutive 3 weeks.

The group I and II rats received the administration of distilled water with a gastric tube at the same dose level.

Animals were given free access to feed and drinking water during the test period, and the feed intake level of each rat was measured daily on weekdays only.

(4) Diabetes model construction

After the composition administration for 5 days, STZ (35 mg/kg) was intraperitoneally administered to the group II rats at satiation.

The administration was carried out under anesthesia with ether.

(5) Examination items

i. body weight

ii. blood glucose level

Blood was collected from caudal vein under anesthesia with ether, and blood glucose was measured with Glutest Ace (manufactured by Sanwa Kagaku Kenkyusyo Co., Ltd.).

iii. blood test

Biochemical test was carried out using serum prepared from the collected blood.

The tests were outsourced to CRC K.K. and Nihon Bioresearch Center Inc.

(6) Sacrifice method

At 4 weeks after completion of the composition administration, the rats were laparotomized under anesthesia with ether and Nembutal (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), and blood was collected from abdominal aorta.

The rats were 13-week old when the dissection was performed.

[0028]

<In vivo function test results>

The examination results, including the blood biochemical test results shown in Table 3, are as follows:

In the group II (DM control group) rats administered with potent oxidant STZ, it was observed that the not only pancreas (high blood glucose level) but also liver functions were lowered.

However, in the group III (agent-administered group) rats administered with the composition (agent) according to the present invention, though the rats were administered with STZ, decreases in

the pancreas and liver functions were prevented. Thus, it was shown that the composition of the present invention had antitoxic activity.

(1) General conditions and death when given orally

No abnormality was observed in all groups, and no death was observed after the oral administration.

(2) Autopsic observations

Gastrointestinal bleeding was observed in the stomach and small intestine of one rat which was administered with the composition, but other abnormalities were not observed.

(3) Blood biochemical tests

No significant difference was observed between the composition (agent) administered group and the normal control group.

When compared to the DM control groups, however, a tendency to suppress the increases in the blood glucose, AST, ALT, and LDH levels was observed. Further, a tendency to suppress the decreases in the total protein, HDL, and body weight levels was also observed.

[0029]

Table 3

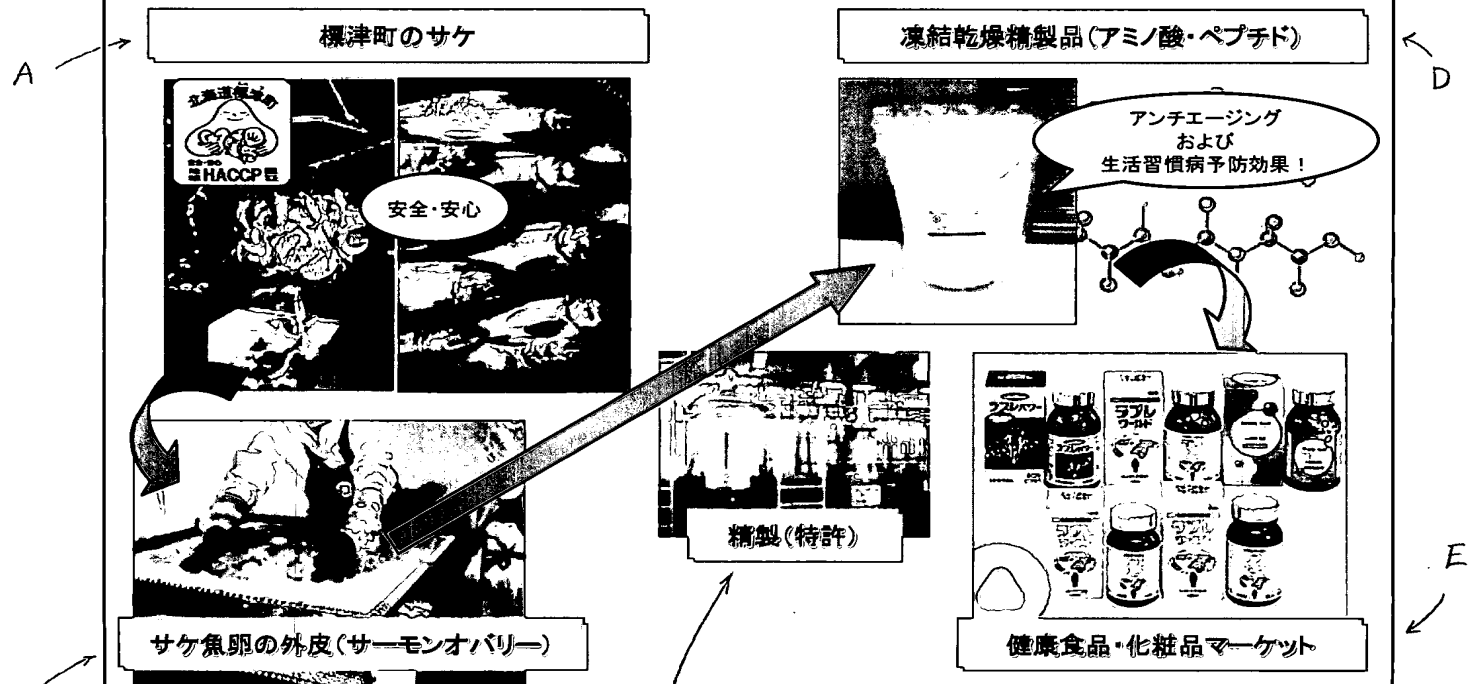
Test Item	Group I: Normal Control Group Means \pm S. D.	Group II: DM Control Group Means \pm S. D.	Group III: Agent-administered Group Means \pm S. D.
Total protein (g/dL)	5.90 \pm 0.42	5.77 \pm 0.27	5.89 \pm 0.45
Albumin (g/dL)	4.04 \pm 0.32	4.01 \pm 0.18	4.01 \pm 0.25
A/G ratio	2.13 \pm 0.25	2.29 \pm 0.17	2.17 \pm 0.23
AST (IU/L)	101.00 \pm 22.26	224.00 \pm 262.63	124.71 \pm 42.39
ALT (IU/L)	39.57 \pm 5.32	91.57 \pm 127.94	48.57 \pm 15.61
LDH (IU/L)	717.29 \pm 369.96	904.57 \pm 438.92	685.71 \pm 309.46
Alkaline phosphatase (IU/L)	585.43 \pm 132.44	513.57 \pm 85.26	571.71 \pm 64.76
γ -GTP (IU/L)	3.00 \pm 0.00	3.00 \pm 0.00	3.00 \pm 0.00
Total bilirubin (mg/dL)	0.10 \pm 0.00	0.10 \pm 0.00	0.10 \pm 0.00
Total cholesterol (mg/dL)	72.86 \pm 11.87	70.57 \pm 7.55	79.43 \pm 13.50
HDL cholesterol (mg/dL)	51.57 \pm 10.95	45.86 \pm 6.41	54.00 \pm 10.88
HDL-cho/T-cho	0.68 \pm 0.05	0.65 \pm 0.08	0.67 \pm 0.05
LDL cholesterol (mg/dL)	9.14 \pm 2.19	11.00 \pm 2.31	10.14 \pm 2.67
Triglyceride (mg/dL)	145.00 \pm 64.53	138.86 \pm 60.11	152.43 \pm 64.81
Urea nitrogen (mg/dL)	25.42 \pm 2.59	26.70 \pm 3.25	27.14 \pm 2.00
Creatinine (mg/dL)	0.21 \pm 0.04	0.23 \pm 0.08	0.21 \pm 0.04
Uric acid (mg/dL)	1.06 \pm 0.28	0.87 \pm 0.31	1.03 \pm 0.30
Na (mEq/L)	143.14 \pm 1.57	142.86 \pm 1.86	144.57 \pm 5.65
K (mEq/L)	4.70 \pm 0.34	4.61 \pm 0.29	4.74 \pm 0.32
Cl (mEq/L)	103.43 \pm 1.40	103.00 \pm 1.29	105.14 \pm 4.22
Ca (mEq/L)	11.33 \pm 0.44	11.31 \pm 0.43	11.19 \pm 0.81
CPK (IU/L)	1396 \pm 1060	1703 \pm 960	1351 \pm 622
Amylase (IU/L)	904.57 \pm 101.54	924.57 \pm 139.00	987.86 \pm 190.09
Insulin (ng/mL)	2.91 \pm 1.43	2.87 \pm 1.34	3.23 \pm 0.63
Blood glucose (mg/dL)	152.57 \pm 21.47	167.29 \pm 29.77	184.86 \pm 30.19
Blood glucose/Insulin	60.37 \pm 23.68	66.80 \pm 25.51	58.84 \pm 13.46
Caudal vein blood glucose (mg/dL)	118.86 \pm 19.43	142.57 \pm 24.37	140.29 \pm 32.50
CRP (mg/dL)	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
Body weight at sacrifice (g)	467.29 \pm 33.99	456.17 \pm 22.04	473.64 \pm 27.48

コア企業：北日本化学(株)(札幌市：化学分析・化粧品製造業)
 連携企業等：(有)フジ・バイオ研究所、(株)神内商店

21

事業計画の概要：サケ魚卵外皮(サーモンオバリー)を原料とする健康食品・化粧品向け有用
 アミノ酸・ペプチドの製造・販売
 ～標津町の地域HACCPのトレーサビリティで安全安心なサケ未利用資源を高付加価値化～

1. 従来、サケの魚肉以外の残さ部分については産業廃棄物として処理されており、有効利用方法としては、皮からコラーゲン、氷頭(頭部の軟骨)からコンドロイチン、白子からDNAを抽出して商品化されているものの、イクラ製造後の外皮(サーモンオバリー)については活用方法が存在していない未利用資源であった。
2. サーモンオバリーから抽出される有用なアミノ酸・ペプチドは、各種栄養素が集中し、多数の生理活性物質が蓄積されている。同様の機能を有する動物由来プラセンタエキスについては、アンチエイジングおよび生活習慣病予防効果が期待され、健康食品や化粧品の原料として需要は拡大しているが、BSE発生以降、動物由来を敬遠する消費者も増えているほか、宗教上の理由から動物由来を使用することが禁じられている地域・市場もある。このため、魚由来のアミノ酸・ペプチドに対する期待が高まっている。
3. 本事業では、豚由来プラセンタエキスを原料とする化粧品を開発・販売している北日本化学(株)がコア企業となり、地元福岡市で辛子明太子の原料であるスケソウタラの卵巣外皮からアミノ酸を抽出する技術を確立し、「魚卵巣外皮からペプチドの抽出技術」として国内外で特許を取得している(有)フジ・バイオ研究所、地域HACCPのトレーサビリティによって安全安心が確立されている標津町で水産加工業を営む(株)神内商店が連携して、サーモンオバリー由来のアミノ酸・ペプチドを抽出し、健康食品や化粧品の原料として製造・販売する。
4. 営業は、北日本化学(株)と(有)フジ・バイオ研究所がそれぞれ担当する。また、北日本化学(株)のグループ企業への出資会社を通じた営業も行う。将来的には、グループ企業が経営する調剤薬局チェーンを通じた健康食品会社、製薬会社等への営業活動も行う予定である。既に健康食品メーカーや商社とは契約の内諾を得ているほか、その他数社からも好感触を得ており市場性が見込まれる。



English translation of Appendix 3

No. 21

Core Company: North Japan Chemical Co., Ltd.

(Sapporo-shi: Chemical Analysis and Cosmetics Manufacturing)

Associated Company: Fuji Bio Technology Institute Co., Ltd.

Jinnai Shoten Co., Ltd.

Summary of Business Plan:

Manufacturing and sales of amino acids and peptides which are useful for health foods and cosmetics and are obtained from salmon roe sac (salmon ovary).

~ High value addition to unused salmon biological resources of which safety is guaranteed based on the tracing by the Shibetsu-cho district HACCP¹⁾ ~

1. Conventionally, almost all of the portions other than meat of salmon have been discarded as industrial wastes. Though collagen extracted from fish-skin, chondroitin extracted from Hizu²⁾ (head cartilage), and DNA extracted from milt are effectively used as products, roe sac (salmon ovary) after the production of Ikura (salmon caviar) is an unused resource of which usage has not yet been developed.

2. In useful amino acid and peptide extracts from salmon ovary, various types of nutrients are concentratedly contained and a large number of physiologically active substances are accumulated. Animal placenta extracts with the similar function have been expected to have anti-aging activity and preventive efficacy on lifestyle-related diseases. The demand for employing the placenta extract as a starting material for health foods and cosmetics has been increased, but consumers who try to shun the use of animal-derived materials are growing after the occurrence of BSE.

In addition, some districts and markets are religiously prohibited from the use of animal-derived materials. Consequently, the use of amino acids and peptides derived from fish is highly expected.

3. In this project, North Japan Chemical Co. Ltd., serving as a core company, Fuji Bio Technology Institute Co., Ltd. and Jinnai Shoten Co., Ltd. collaborate in extraction of amino acids and peptides from salmon ovaries, in production of health foods and cosmetics made from the amino acid/peptide extracts, and in sales of the same products. North Japan Chemical is a developer/seller for cosmetics made from porcine placenta extracts. Fuji Bio Technology Institute has established a technology to extract amino acids from ovary sacs of walleye pollack from which Karashi Mentaiko³⁾ (spiced and marinated pollack roe) is produced at the Japan local, Fukuoka-shi, and held patent rights in Japan and other countries for "extracting techniques for peptides from fish ovary sacs". Jinnai Shoten carries on a business of processed marine products of which safety is guaranteed based on the tracing by the district HACCP in Shibetsu-cho, Japan.

4. Both North Japan Chemical and Fuji Bio Technology Institute take charge of sales and marketing. In addition, the products are distributed to group companies of North Japan Chemical through an investing company. In the future, business activities of selling the products to health food companies and pharmaceutical companies through dispensing pharmacy chain stores operated by group companies are planned. Informal contracts with some health foods manufacturers and trading companies have been already made. Other several companies are also showing interests in this business. Thus, the marketability of this business is quite high.

A. Salmon of Shibetsu-cho

Guaranteed safety

B. Salmon roe sac (salmon ovary)

C. Purification (patents)

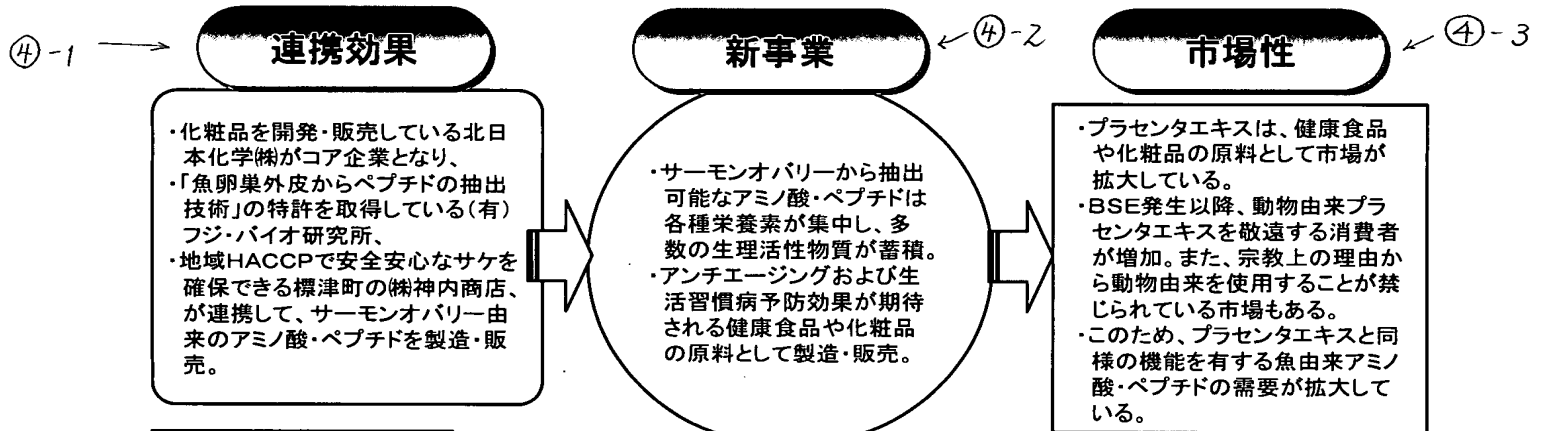
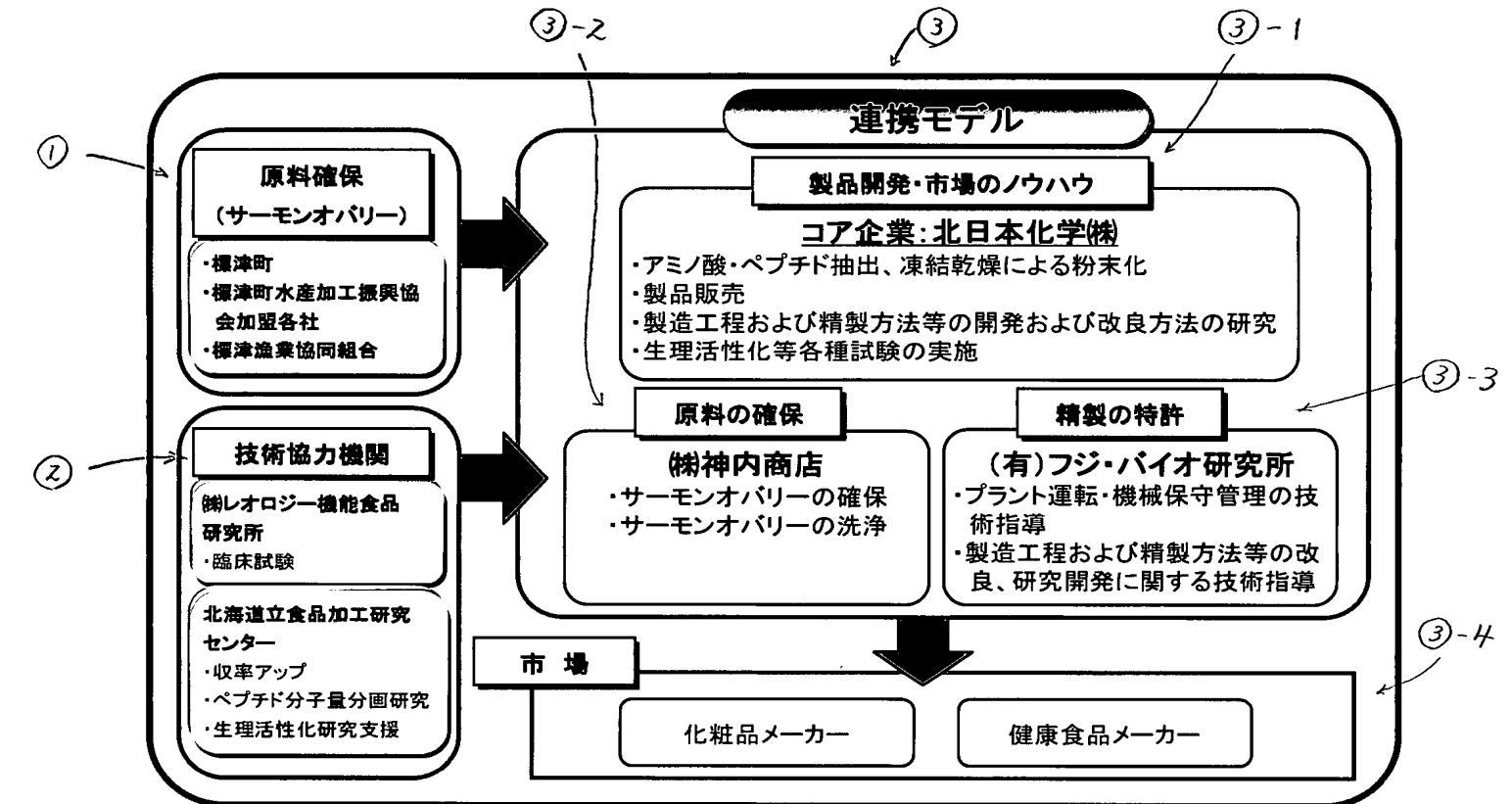
D. Lyophilized purified products (amino acids and peptides)

Anti-aging and prophylactic efficacy on
lifestyle-associated diseases

E. Health food/cosmetic markets

Remarks:

- 1): "HACCP" is an abbreviation for "Hazard Analysis and Critical Control Point".
- 2): "Hizu" is a Japanese word which literally means "ice head", probably because in form and color the salmon head cartilage looks like ice.
- 3): "Karashi Mentaiko" is spicy one of the various marinated roe products of the pollack. The word "Mentaiko" is derived from the Korean word for Alaska pollack, "myong tae" and the Japanese word for "child", "-ko".



支援メニュー

【支援金融機関】 北洋銀行

【活用(予定)支援メニュー】 ①補助金 ②設備投資減税 ③信用保証の特例

コア企業の会社概要

企業名・代表者	北日本化学(株) 代表取締役 盛 孝男	
所在地	札幌市厚別区厚別南5丁目1番7号	
創立	平成13年10月	
資本金・従業員数	4,500万円	10名
TEL/FAX	011-896-3300	011-896-5577
e-mail	a.takahasi@ost-japan.com	
URL	http://www.kitanichi.jp/	

English translation of Appendix 4

- ① To secure starting materials (salmon ovaries)
 - Shibetsu-cho¹⁾
 - Shibetsu-cho Processed Marine Products Promotion Consortium member companies
 - Shibetsu-cho Fisheries Cooperative Association²⁾

- ② Technology alliance organizations
 - Rheology Functional Food Research Institute Co., Ltd.
 - Clinical trials
 - Hokkaido Food Processing Research Center³⁾
 - Yield improvement
 - Research of peptide molecular weight fractionation
 - Support of bioactivation research

- ③ Collaboration Model
 - ③-1 Know how to develop/market products
 - Core company: North Japan Chemical Co., Ltd.
 - Extraction of amino acids and peptides, pulverization via freeze-drying
 - Sales of products
 - Development of manufacturing processes and purifications, and research for modifications thereof
 - Operation of various tests such as bioactivation

 - ③-2 To secure starting materials
 - Jinnnai Shoten Co., Ltd.
 - To secure salmon ovaries
 - To wash salmon ovaries

③-3 Patents covering purification techniques

Fuji Bio Technology Institute Co., Ltd.

- Technical assistance of plant operation and machine maintenance
- Improvement of manufacturing processes and purifications, and technical assistance for research and development

③-4 Market

Cosmetic manufacturers

Health food manufacturers

④-1 Collaboration Advantages

- North Japan Chemistry Co., Ltd. developing and selling cosmetics acts as the core company;
- Fuji Bio Kenkyusyo limited Company having patents for "extracting technology for peptides from fish ovary sacs"; and
- Jinnai Shoten Co., Ltd. in Shibetsu-cho securely providing salmon which is guaranteed its safety by the district HACCP, these companies collaborate to produce and sell amino acids and peptides derived from salmon ovary.

④-2 New Business

- In amino acid/peptide extracts from salmon ovaries, various types of nutrients are concentratedly contained and a large number of physiologically active substances are accumulated.
- Production and sales of the amino acids and peptides as raw materials for health foods and cosmetics which are expected to exert anti-aging activity and preventing efficacy on lifestyle-related diseases.

④-3 Marketability

- The market wherein the placenta extract is used as a raw material for health foods and cosmetics is expanding.
- The number of consumers trying to avoid the use of animal-derived placenta extracts is increasing from the occurrence of BSE. In addition, some markets are religiously prohibited from using animal-derived materials.
- Consequently, the demand for fish-derived amino acid/peptide extracts having the similar efficacy as that exerted by the placenta extract is increasing.

⑤ Assistance menu

[Assistance from financial institution] Hokuyo Bank
[Applicable (plan) assistance menu] (1) Bounty, (2) Tax reduction based on facility investment, (3) Credit guarantee program exception

⑥ Profile of Core company

Company Name and Representative: North Japan Chemical Co., Ltd.

Representative Director Takao MORI

Address: 5-1-7 Atsubetsu-Minami, Atsubetsu-ku, Sapporo-shi

Foundation: October 2001 (Heisei 13)

Capital: 45 million yen

Employee number: 10

TEL: 011-896-3300

FAX: 011-896-5577

e-mail: a.takahasi@ost-japan.com

URL: <http://www.kitanichi.jp/>

Remarks:

- 1): Shibetsu-cho is a local government in Nemuro Subprefecture, Hokkaido Prefecture, Japan, also called "Shibetsu Town".
- 2): Shibetsu-cho Fisheries Cooperative Association is the biggest Japanese salmon fisheries in the coastal area of Japan.
- 3): Hokkaido Food Processing Research Center is an official institute, established and supported by the Hokkaido Government, Japan.

①

サケの卵巣（筋子）



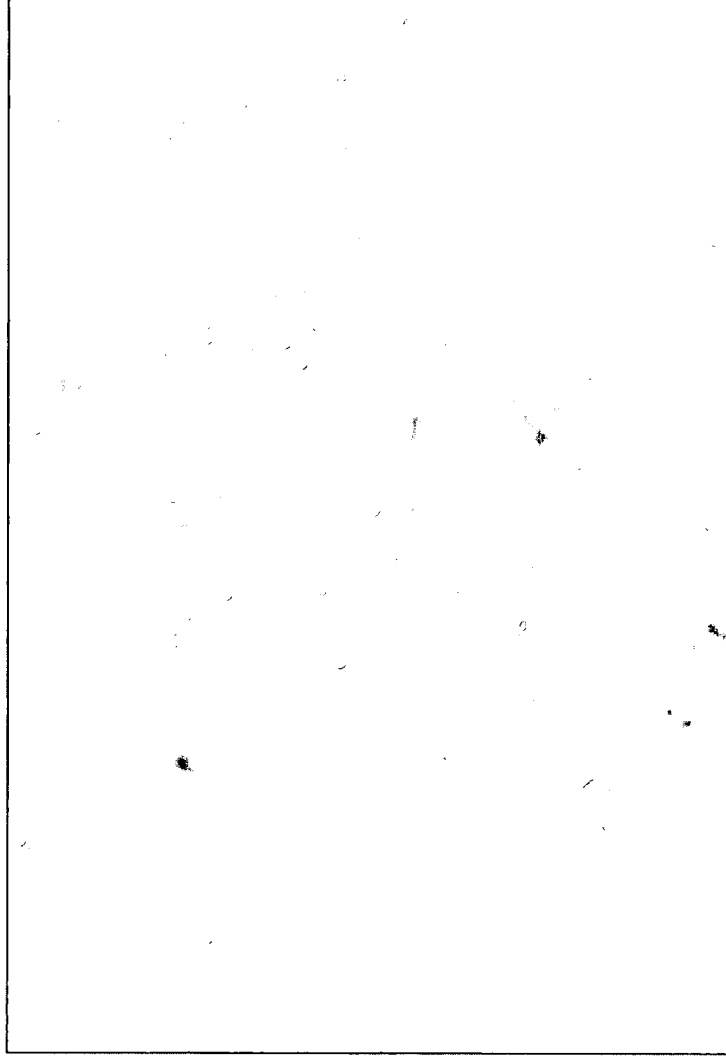
②

卵巣（筋子）より取り出した卵（イクラ）



③

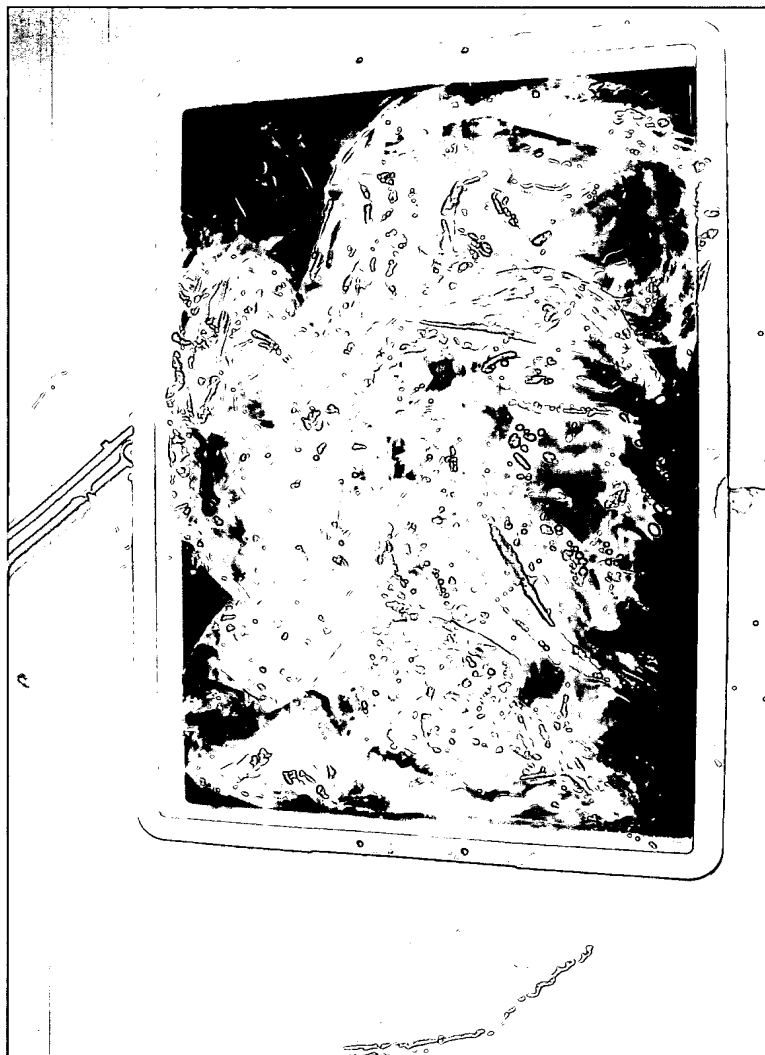
卵巣より卵（イククラ）を取り除いた、卵巣外皮：赤色の点々は未熟卵



④

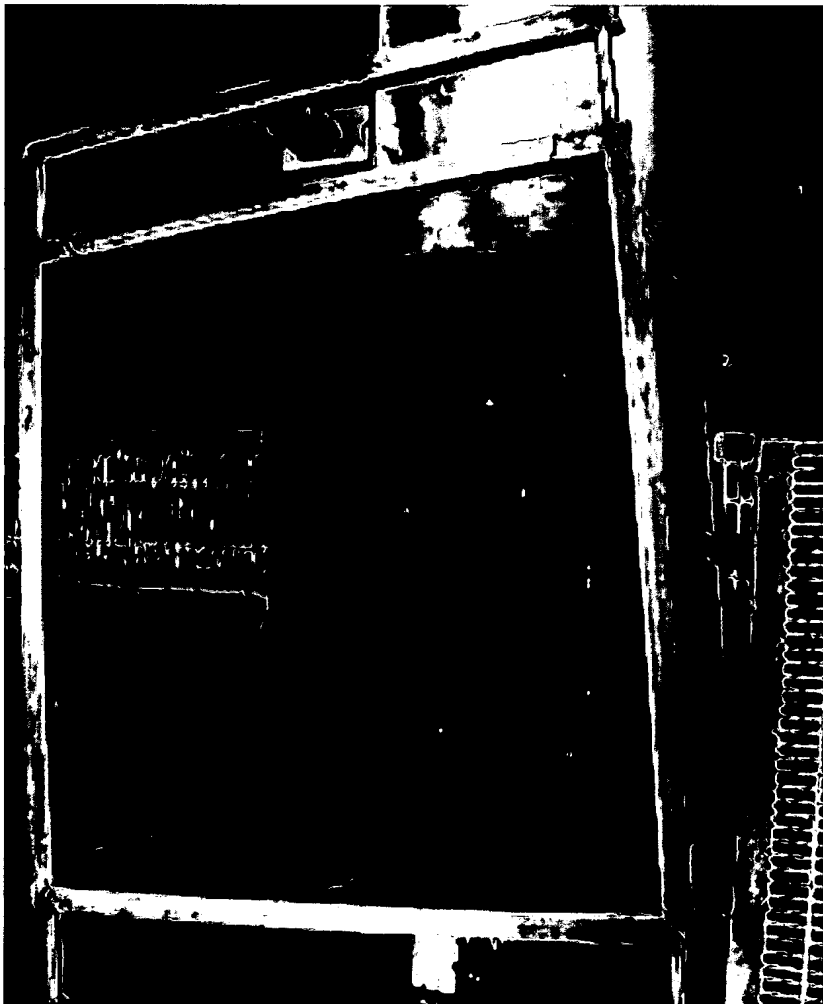
魚卵外皮を水洗いした、卵巣外皮





卵巣より卵を除去した卵巣外皮

⑤



卵巣外皮より血抜きした卵巣外皮

⑥



血抜きした魚卵外皮を冷水で洗浄した卵巣外皮

⑦

English translation of Appendix 5

① Whole salmon ovary (Sujiko)

Remarks: "Sujiko" is a Japanese word composed of "Suji", which means "line" and refers to how the eggs are lined up in the ovary and "-ko" which means "child".

② Salmon caviar (Ikura) prepared
from whole salmon ovary (Sujiko)

Remarks: Salmon caviar (Ikura) is the individual mature eggs of salmon, separated from ovary sac, and cleaned of all skins and veins.

"Ikura" is a Russian word (Nkpa) which means "fish roe" in general, and is widely used in international commerce, especially referring to salmon caviar.

③ Salmon ovary sac (ovary skin) obtained by removing individual eggs (Ikura) from whole ovary: red dots are immature eggs

④ Salmon ovary sac (ovary skin) rinsed and drained with water

⑤ Ovary sac (fish egg skin) obtained by removing eggs from fish ovary

⑥ Ovary sac after bloodletting

⑦ Ovary sac washed with cold water after bloodletting



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of : **Confirmation No. 1656**
Kunihiko KODAKA : Attorney Docket No. 2003_1777A
Serial No. 10/733,627 : Group Art Unit 1651
Filed December 12, 2003 : Examiner Susan M. Hanley

METHOD FOR PRODUCING AMINO ACID : **Mail Stop: AF**
COMPONENTS BY ENZYMATIC
HYDROLYSIS OF FISH EGG SKIN

REQUEST FOR INTERVIEW

THE COMMISSIONER IS AUTHORIZED
TO CHARGE ANY DEFICIENCY IN THE
FEES FOR THIS PAPER TO DEPOSIT
ACCOUNT NO. 23-0975

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

If the amendments and remarks submitted herewith are not deemed to place the application in condition for allowance, the Examiner is respectfully requested to contact the undersigned to discuss the outstanding issues. It is Applicant's opinion that the amendments and remarks set forth herein clearly establish patentability over the cited art of record. The undersigned looks forward to further communication from the Examiner.

Respectfully submitted,

Kunihiko KODAKA

By: Warren M. Cheek, Jr.
Warren M. Cheek, Jr.
Registration No. 33,367
Attorney for Applicant

WMC/AES/nrj
Washington, D.C. 20006-1021
Telephone (202) 721-8200
Facsimile (202) 721-8250
June 7, 2007